第5卷 第3期 动物学研究 Vol. 5, No. 3
1984年 8月 ZOOLOGICAL RESEARCH Aug., 1984

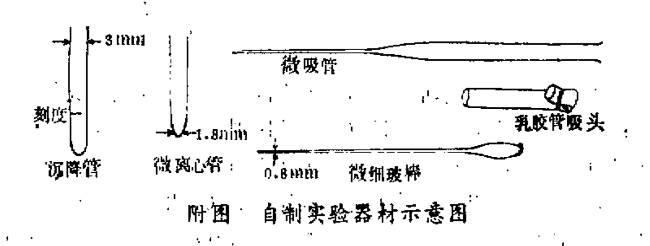
人体末梢血微核测试法的研究

薛开先 丁邦裕 蔡逸云 孙玉洁 周平 马国建 王苏
(江苏省肿瘤防治研究所细胞遗传室)

微核测试法（micronucleus test）是常用的遗传毒理学方法之一。近年来，被广泛用来评价各种理化因子的致癌、致突变效应、监察环境污染等，而且比较迅速而敏感（Wild, 1978; Adler, 1980; Tate *et al.*, 1980; Heddle, 1973; Schmid, 1977）。以往常用的实验材料是某些动植物的组织（Heddle, 1973; Schmid, 1977; 山东海洋学院遗传教研组，1981）。较近，有作者报导了人体静脉血和骨髓细胞微核法（Jensen, 1977; Countryman, 1976; 云南省动物研究所二室辐射细胞组、上海市工业卫生研究所三室血液组，1978），我们首先简报了1滴人手指血的微核测试法(薛开先等，1982)。一年多来临床应用此法检查健康人，接触有害理化因子的人员近1500余例次，获得了满意的结果，同时对实验过程中的一些影响因素进行了探讨，并作了改进。现将制片程序、注意事项及117例健康人正常值范围及末梢血与静脉血微核率的比较等初报如下。

一、制片过程

（一）器材　由于用血量甚微，采血及分离淋巴细胞用的玻璃器材微型化，均用优质玻璃管自制，其规格如附图所示。



附图　自制实验器材示意图

（二）制片程序

1.受试者无名指常规消毒，用消毒之三棱针或7号针尖刺血，微吸管连续吸血0.06ml左右。该血量适用于受检者淋巴细胞绝对数1.500/mm³左右，若淋巴细胞多则减量，最少可减至0.03ml；若淋巴细胞少者，应酌量增量至0.1ml左右。

* 本文承刘祖洞教授审阅，谨致谢意。

本文1982年10月4日收到，1983年7月22日收到修改稿。

2.立即将末梢血小心地注入沉降管，把玻棒插入血中，在一个方向旋转3—5分钟，纤维蛋白都裹于玻棒上，压紧，然后小心抽出玻棒，即制成抗凝血。

3.加入新鲜配制的3%明胶，其量为上述抗凝血的1/2～1/3，再插入玻棒，小心地上下搅动，使两者完全混匀。

4.垂直置沉降管于37°C培养箱中，自然沉降45分钟左右。

5.用微血管尽可能地吸尽上清液，注入离心管中，经1500rpm离心5分钟后，吸弃上清液，用沉淀物推片，如此多数标本可获得2000个以上的淋巴细胞。

6.待片干后，即将推片在100%甲醇中固定40秒，通过70%甲醇40秒，用1:10Giemsa（pH6.4磷酸缓冲液）染液染色4分钟左右，自来水分色30秒，这种制片细胞核、微核呈紫红色，胞质淡蓝、红细胞很少着色，背景清洁。

（三）注意事项

1.沉降前的实验过程，要防止血中有气泡产生；加明胶后的实验过程，尽量在接近37°C的条件下进行，实验室温度不应低于18°C，否则会影响淋巴细胞的数量和纯度。

2.整个实验过程中淋巴细胞损失主要环节是①沉降后的上清液没有吸尽；②离心后的沉淀物未能尽量多地吸来推片。

3.吸弃上清液时，应根据实验室温度、湿度留下适量上清，推片2cm左右为宜。

4.新鲜制片染色鲜明，存放一、二天后染色效果下降，有时会给读片带来困难。

5.根据本实验室观察，约40%受检者淋巴细胞中含有嗜天青颗粒，因此应注意与微核相鉴别，参见下表。

表1 嗜天青颗粒与微核的比较

	微核	嗜天青颗粒
数量	多数细胞含1个，少数2个，3个罕见	常有4—8个
大小	一般较大	一般较微核小
形态	规整、多为圆形或椭圆形	可不规整
折光性	调节物镜焦距，呈色变化与主核边缘相似或稍亮。	变化大，从呈色较主核为深，直至为发亮的颗粒。
Feulgen反应	阳性，呈紫红色。	阴性，为发亮的颗粒。

在多数情况下，根据表1前四项指标即可将两者区别，尤其折光性的差异是一个很有用的指标；但当一些大的嗜天青颗粒与微核区别有困难时，记下片号与座标，作DNA特异性染色的Feulgen反应是有必要的，此反应可按Schwazacher的方法，（Schwarzacher *et al*，1974）值得提出的是①将复检片浸于70%甲醇中5分钟，即可使细胞完全脱色；②为防止细胞脱落，标本可在22°C 5*N* HCl中水解20分钟；③根据呈色反应，对两者可作出明确判断。

二、健康人微核率的测定

检查对象主要是南京地区献血员和少数健康卫生人员，共117例，其中男性58例，女性59例。年龄19岁至61岁，其中绝大多数为20～50岁。

微核判断标准：与主核完全脱离，染色与主核一致或稍淡，折光性应与主核相似，直径应小于主核的1/3，呈圆形或椭圆形，边缘规整。

本组微核制片，106例分析2,000个淋巴细胞，其余11例分析1,000～1,729个淋巴细胞。总计读数225,389个淋巴细胞，共有微核26个，多数为单微核，平均微核率为0.12‰。健康人微核率的分布参见下表。

表2　　117例健康人淋巴细胞微核率的分布

微核率‰	0	0.5	1.0	共计
例数	99	10	8	117

从上表可见，在15.4%健康人中观察到淋巴细胞微核，全部健康人的微核率≤1‰。按百分位数法可求得本组微核率正常值范围为0～1‰，这与一些作者用静脉血微核制片的观察结果基本相一致（杨家宽等，1980；金敖庆等，1979）。

比较分析了微核率在健康人不同年龄组的分布，结果表明在不同年龄组微核率的分布范围均是0－1‰（表3），根据u测验的结果，各组间平均微核率的差异均无显著意义（$P>0.05$）。

表3　　微核率在健康人不同年龄组的分布

		各年龄组的例数与百分率		
		19～29岁*	30～39岁	40～61岁*
微	0‰	29(80.6%)	35(79.6%)	32(86.5%)
核	0.5‰	4(11.1%)	6(13.6%)	3(8.1%)
率	1‰	3(8.3%)	3(6.8%)	2(5.4%)
平均微核率		0.14‰	0.11‰	0.10‰

* 19岁，52岁，61岁各1例

微核率在不同性别的健康人群中的分布已进行了分析。从表4可见，微核率的分布范围也是0－1‰，平均微核率在不同性别间的差异亦无统计学意义（$u=0.5$，$P>0.05$）。

表4　　微核率在不同性别人群中的分布

		微核率			平均微核率
		0	0.5‰	1‰	
例数与百分率	男	51(87.8‰)	3(5.2‰)	4(6.9‰)	0.10‰
	女	48(81.3‰)	7(11.9‰)	4(6.8‰)	0.13‰

三、静脉血和末梢血微核检测法的比较

以往对静脉血淋巴细胞微核已进行了一些研究，为了与此比较，由同一组实验人员

对本所50例门诊病员（多数为肿瘤患者），分别同时作静脉血与末梢血的微核制片，然后由同一实验人员阅片，所得结果归纳入表5。

表5 静脉血与末梢血微核检测法的比较

采血途径	阳性*	阴性	合计	阳性率(%)
静脉血	12	38	50	24
末梢血	8	42	50	16

* 微核率超过正常值高限1‰者为阳性

对上述50例，同一病员两种微核检测方法所得的结果，按配对资料进行x^2检验，结果$x^2=2.25$，由于$x^2_{0.05(1)}=3.84$，故静脉血与末梢血淋巴细胞微核检测法所得的结果无明显差异，平均微核率的比较也证实这一点（参见表6）。

表6 静脉血与末梢血平均微核率的比较

采血途径	例数	计数淋巴细胞数	平均微核率(%)
静脉血	50	115000	0.70
末梢血	50	115000	0.70

四、不同采血时间对末梢血微核率的影响

为了观察不同采血时间对微核率的可能影响，对20例放射线工作人员短期内作了两次微核检测，所得结果列在表7。

表7 不同采血时间对微核率的影响

	阳性	阴性	合计	阳性率(%)
第一次检测	3	17	20	15
第二次检测	2	18	20	10

对上述结果按配对资料进行x^2检测，结果$x^2=0$，故短期内同一人的不同次检测，对其淋巴细胞微核率无明显影响，比较表8中，不同次检测的平均微核率结果亦相似。

表8 不同采血时间平均微核率的比较

	例数	计数淋巴细胞数	平均微核率(%)
第一次检测	20	38936	0.51
第二次检测	20	40500	0.54

五、讨论与小结

随着原子能应用的日益普及，工业"三废"的排出和农药的普遍应用，人类已直接暴露在污染的环境之中，同时由于职业和治疗的需要，人类必须接触理化因子的种类也

在不断增多，因此如何从环境中及早地检测出可能致癌、致突变的因子，或检测其对人类损伤程度，已成为十分关注的问题。以往可用于人类，适用于这一目的检查的方法并不多，这样建立更为简捷、敏感的细胞遗传学方法，显然是具有重要的实践意义。

有鉴于此，本实验室在改良前人工作的基础上，建立了末梢血微核测试法。从1500余例次的实践结果看来①该法简便，无需特殊器材，易于应用和掌握；②仅需1—2滴指血，较静脉血微核法更易被受检者所接受，且两者结果无明显差异；③制片方法稳定，无论在实验室，还是在现场（血库、病房和工厂等），只要按上述程序进行，均可获得满意的结果；④制片迅速，4个人在4小时内可完成35人的制片；⑤结果重复性高，两次不同时间的微核数据基本相同；⑥在正常人群中，微核出现率（淋巴细胞中有微核的被检者占该组的百分率）低，微核率偏离度亦较小；而在长期接触致癌，诱变因子的人群以及癌症患者中，微核出现率、微核阳性检出率（微核率超过正常值高限1‰者占该组的百分率）、平均微核率均有显著的提高。其他作者用静脉血微核法也获得了类似的结果（史纪兰等，1981；钟宝珍等，1982；张昌杰等，1980）。综上所述，我们可以初步把末梢血微核法作为一种快速、简便、敏感的细胞遗传学方法推荐给临床，尤其是对受有害因子影响的人群，作致癌、致突变远期效应调研时，更为合宜。

参 考 文 献

山东海洋学院遗传教研组　1981　遗传(2):23。

云南省动物研究所二室辐射细胞组、上海市工业卫生研究所三室血液组　1978　遗传学报5:142。

史纪蓝、黄权光　1981　遗传(3):4。

金敖庆等　1979　安医学报(3):28。

钟宝珍等　1982　微核(2):1。

张昌杰等　1980　华中师范学院学报(2):49。

杨家宽等　1980　核防护(3):64。

薛开先等　1982　遗传(2):3。

Adler I-D 1980 ibid. 74:77。

Countryman PL and Heddle TA 1976 ibid 4:321。

Heddle TA 1973 ibid 18:187。

Jensen MK 1977 *Mutation Res* 45:249。

Schmid W. 1977 The micronucleus test, in "handbood R of mutagennecity test procedures", 235, Elservier, Amstemdem.

Schwarzacher HG *et al*. 1974 Methods in human cytogenetics, 229, Spring-Verlag, Berlin.

Tate AD *et al*. 1980 ibid 74:11.

Wild D. 1978 *Mutation Res* 56:319.

A STUBY OF MICRONUCLEUS TEST BY HUMAN SKIN PUNCTURE

Xue Kaixian Ding Bangyu Cai Yiyun
Sun Yujie Zhou Ping Ma Guojian Wang Su

(Cancer Institute of Jiangsu Province, Nanking)

Micronucleus test is one of the routine methods of genetic toxicology. Its experimental materials are the tissues of animals and plants. Recently human bone marrow cells and venous blood lymphocytes have also been used. In this paper micronucleus test by human skin puncture is first described and some factors affecting the procedure are discussed. This test needs only a drop of finger blood. According to about 1000 clinic cases, we consider that the micronucleus test by human skin puncture is a rapid, convenient and sensitive procedure for detecting mutagens and cacinogens and very useful in epidemiological investigation.